

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ana Širić

7260/BT

**BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE IZOLIRANE
IZ MAJČINOG MLIJEKA**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biotehnologija 4

Mentor: Prof. dr.sc. Blaženka Kos

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE IZOLIRANE IZ MAJČINOGLIJEKA

Ana Širić, 0058208871

Sažetak: Majčino mlijeko sadrži brojne supstance, a uz to i žive bakterije koje koloniziraju neonatalni gastrointestinalni trakt (GIT) dojenčeta. Cilj ovog rada bio je izolirati bakterije mliječne kiseline (BMK) iz majčinog mlijeka. Izolacija je provedena uspješno, pri čemu je izolirano 60 novih bakterijskih sojeva kojima su ispitani genotipski profili bakterijskih izolata amplifikacijom DNA korištenjem univerzalne M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') početnice. Ispitana je također prisutnost gena koji kodiraju za S-proteine u genomu sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka. RAPD-PCR analiza produkata dobivenih sa specifičnim Usl početnicama je pokazala da svi ispitani sojevi BMK u genomu sadrže jedan ili više gena koji kodiraju za S-proteine. Rezultati SDS-PAGE pokazuju da nijedan uzorak površinskih proteina ne sadrži karakterističnu proteinsku vrpcu koja bi ukazala da ispitivani sojevi BMK eksprimiraju S-proteine.

Ključne riječi: bakterije mliječne kiseline, gastrointestinalni trakt, majčino mlijeko, S-proteini

Rad sadrži: 33 stranice, 10 slika, 8 tablica, 47 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u: Knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *Prof.dr.sc. Blaženka Kos*

Pomoć pri izradi: *Martina Banić, mag. ing. biotechn.*

Rad predan: rujan, 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Culture Technology

LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM BREAST MILK

Ana Širić, 0058208871

Abstract: Breast milk contains numerous substances and also alive bacteria colonizing neonatal gastrointestinal tract (GIT) of an infant. Purpose of this thesis was to isolate lactic acid bacteria (LAB) from breast milk. Isolation was carried out successfully, whereby 60 new bacterial strains were isolated and examined for genotypic profiles with DNA amplification using universal M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') primer. Existence of genes which codes for S-proteins in genom of strains isolated from breast milk, was also examined. RAPD-PCR analysis of products obtained with specific *Usl* primers showed that all tested LAB strains contain one or more genes encoding S-proteins in the genomes. Results indicate that neither sample of surface proteins does not contain characteristical protein band, which represents expression of S-proteins in examined LAB strains.

Keywords: breast milk, gastrointestinal tract, , lactic acid bacteria, S-proteins

Thesis contains: 33 pages, 10 figures, 8 tables, 47 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic (pdf format) version deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *PhD, Blaženka Kos, Full professor*

Technical support and assistance: *Martina Banić, mag. ing. biotechn.*

Thesis delivered: September, 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Majčino mlijeko kao izvor nutrijenata nužnih za razvoj djeteta	2
2.1.1. Faze laktacije	2
2.1.2. Makronutrijenti	2
2.1.3. Mikronutrijenti	2
2.1.4. Bioaktivni faktori	3
2.2. Dobrobiti dojenja	4
2.2.1. Antiinfektivno djelovanje	4
2.2.2. Antiinflamatorno i imunomodulatorno djelovanje	4
2.2.3. Metaboličko djelovanje	4
2.3. Razvoj mikrobiote djeteta	5
2.3.1. Oligosaharidi u mlijeku	5
2.4. Mikrobiota majčinog mlijeka	7
3. MATERIJALI I METODE RADA	11
3.1. Materijali	11
3.1.1. Uzorci majčinog mlijeka	11
3.1.2. Hranjive podloge	11
3.1.3. Kemikalije	12
3.1.4. Aparatura i pribor	13
3.2. Metode rada	14
3.2.1. Radni mikroorganizmi	14
3.2.2. Izolacija bakterija iz roda <i>Lactobacillus</i> iz majčinog mlijeka	14
3.2.3. Pohranjivanje bakterijskih sojeva	14
3.2.4. Održavanje i čuvanje bakterijskih sojeva	14
3.2.5. Izolacija genomske DNA iz bakterijskih sojeva	15

3.2.6. Mjerenje koncentracije DNA	15
3.2.7. RAPD-PCR (eng. Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase chain reaction)	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Izolacija bakterija mliječne kiseline iz prikupljenih uzoraka majčinog mlijeka te ekstrakcija njihove genomske DNA	20
4.2. RAPD-PCR.....	21
4.3. Analiza prisutnosti S-proteina	24
5. ZAKLJUČCI	28
6. LITERATURA	29

1. UVOD

Dojenje je prvi oblik hranjenja novorođenčadi i omogućava dotok svih nutrijenata potrebnih za prvih 6 mjeseci života. Majčino mlijeko je kompleksna biološka tekućina specifična za pojedinu vrstu, koja savršeno zadovoljava nutritivne potrebe novorođenčeta. Mlijeko pruža zaštitu protiv različitih zaraznih bolesti te tako pokazuje manje oboljenja kod dojenčadi za razliku od djece koja nisu dojena. Sadrži različite bioaktivne komponente koje bi mogle biti zaslužne za antiinfektivno, antiinflamatorno djelovanje te ima različite metaboličke uloge. Komponente koje se nalaze u mlijeku su imunoglobulini, oligosaharidi, stanice imuno sustava, laktoferini, lizozimi, glikoproteini i bioaktivni peptidi. Mikrobiota majčinog mlijeka se mijenja tijekom perioda dojenja : razvija se i najveću kompleksnost postiže tijekom trećeg tromjesečja trudnoće, tijekom laktacije zadržava konstantnost, smanjuje se u periodu odvikavanja i nestaje kako nestaje mlijeka u mliječnim žlijezdama. Tradicionalno, majčino mlijeko se smatralo sterilnim, međutim, dokazano je kako mlijeko predstavlja stalan izvor mutualističkih i potencijalno probiotičkih bakterija za crijeva novorođenčadi. Ono predstavlja glavni izvor bakterija za crijeva djeteta budući da novorođenčad konzumira oko 800 mL mlijeka dnevno. Time dnevno unosi oko $8 \cdot 10^4 - 8 \cdot 10^6$ mutualističkih bakterija i to više od 200 različitih vrsta. Mlijeko je potencijalan izvor probiotičkih bakterija kao što su streptokoki, laktobacili i bifidobakterije za koje se smatra da imaju glavnu ulogu u prvoj fazi kolonizacije crijeva novorođenčadi (Heikkilä M. i sur.,2003).

Cilj ovog završnog rada je bio izolirati sojeve bakterija mliječne kiseline (BMK) iz prikupljenih uzoraka majčinog mlijeka te provesti ekstrakciju njihove genomske DNA kako bi se mogla ispitati prisutnost gena koji kodiraju za S-proteine u genomu sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka pomoću Usl početnica. U istu je svrhu također provedena izolacija i SDS-PAGE površinskih proteina sa stanica izoliranih sojeva bakterija mliječne kiseline kako bi se provjerila eventualna ekspresija i prisutnost specifičnih S-proteina koji imaju važnu ulogu u probiotičkim svojstvima sojeva BMK koje ih posjeduju. S-proteini su u direktnom kontaktu s bakterijskim okolišem i stoga vrlo često utječu na mnoga površinska svojstva, važni su za zadržavanje staničnog oblika, igraju važnu ulogu u površinskom prepoznavanju i služe kao zaštitni omotači od štetnih uvjeta okoliša uključujući promjene u okolišnom pH, mehanički i osmotski stres, antimikrobne peptide i bakteriolitičke enzime, radijaciju te bakteriofage i druge mikrobne predatore.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Majčino mlijeko kao izvor nutrijenata nužnih za razvoj djeteta

Dojenje prvih 6 mjeseci djetetova života i zatim kontinuirano dojenje godinu do dvije se smatra standardom dojenja djeteta (WHO, 2003). Majčino mlijeko je jedinstveno i kao takvo odgovara novorođenčetu kako po nutritivnoj kompoziciji tako i po ostalim bioaktivnim faktorima koji su odgovorni za zdravi razvoj djeteta. Za razliku od formuliranih pripravaka, sastav majčinog mlijeka se mijenja se tijekom perioda dojenja, a kod različitih majki se također razlikuje. (Ofstedal, 2012).

2.1.1. Faze laktacije

Prvo mlijeko koje se stvara u mliječnim žlijezdama je kolostrum. Ono nastaje u malim količinama prvih dana nakon porođaja. Kolostrum je bogat imunološkim komponentama kao što su laktoferini, leukociti te faktori za rast epiderme. U odnosu na mlijeko koje kasnije nastaje, pokazuje veću koncentraciju natrija, klorida i magnezija a manju kalija i kalcija. Sastav mlijeka se mijenja te nakon 2 tjedna, ono je većinom zrelo. Mlijeko koje nastaje u razdoblju od četvrtog do šestog tjedna nakon porođaja je potpuno zrelo. Nakon ovog razdoblja, mlijeko je relativno slično po sastavu, ali može doći do neznatnih promjena tijekom laktacije (Castellote i sur., 2011).

2.1.2. Makronutrijenti

Sastav makronutrijenata majčinog mlijeka varira među majkama i mijenja se tijekom laktacije. Mlijeko majki koje rode u terminu sadrži 0.9 do 1.2 grama proteina po decilitru mlijeka, 3.2 do 3.6 g masti po decilitru mlijeka te 6.7 do 7.8 grama laktoze po decilitru mlijeka. Kalorijska vrijednost je otprilike 65 do 70 kilokalorija po decilitru i usko je povezana s udjelom masti. Sastav makronutrijenata se razlikuje kod majki koje rode prije termina i onih koje rode u terminu, pri čemu mlijeko majki koje rode u terminu je znatno nižeg udjela masti i proteina. Od masti, prisutni su visoki udjeli palmitinske i oleinske kiseline. Masti su nutrijenti čije se koncentracije tijekom dojenja najviše mijenjaju. Mlijeko koje majka proizvodi pri kraju dojenja ima dva do tri puta veće koncentracije masti od onih na početku (Saarela T i sur.,2005.).

2.1.3. Mikronutrijenti

Mikronutrijenti također variraju u majčinu mlijeku i ovise o prehrani trudnice. Tijekom laktacije potrebno je paziti na unos vitamina (A, B1, B2, B6, B12, D te joda) (Allen i sur.,2012). Unatoč

načinu prehrane, znatno je smanjen udio vitamina K, što je povezano s smanjenom izloženošću majki suncu (Dawodu i sur., 2014).

2.1.4. Bioaktivni faktori

Tablica 1. Glavni bioaktivni faktori u majčinu mlijeku (preuzeto od Ballard, 2013)

Komponente	Funkcija
Stanice –makrofagi	Zaštita od infekcija, aktivacija T-stanica
Imunoglobulini- IgG	Inhibicija vezanja patogena
- IgA/sIgA	Antiinflamatorno djelovanje, odgovor na alergene
Kemokini- MIF	Povećava antipatogenu aktivnost makrofaga
Faktori rasta- eritropoetin	Eritropoeza
- NGF	Rast neurona
- IGF	Stimulacija rasta i razvitka
Hormoni- kalcitonin	Razvoj neurona
- somatostatin	Regulacija rasta epitela želuca
Antimikrobni faktor- laktoferin	Antibakterijsko i antioksidativno djelovanje
Metabolički hormoni- adiponektin	Redukcija težine novorođenčadi
- leptin	Regulacija apetita
Oligosaharidi- gangliozi	Razvoj mozga
- HMOS	Prebiotik, stimulira kolonizaciju s korisnim bakterijama
Mucini	Blokiraju infekciju izazvanu virusima ili bakterijama

2.2. Dobrobiti dojenja

Mlijeko je kompleksan izvor bioaktivnih molekula koje štite novorođenčad od infektivnih bolesti te potiče razvoj dok istodobno obogaćuje crijevnu mikrofloru. Nekoliko studija povezuje dojenje sa smanjenjem mortaliteta novorođenčadi, manje infektivnih bolesti te povećanim odgovorom imunološkog sustava. Dojenje zaštićuje od dijareje te je povezano s manjom mogućnosti za razvoj nekrotizirajućeg enterokolitisa, ali i boljim kognitivnim sposobnostima, razvoju i općenitim zdravljem djeteta (Haschke i sur., 2013).

2.2.1. Antiinfektivno djelovanje

Prema Američkoj pedijatrijskoj akademiji, dojenje u trajanju više od četiri mjeseca smanjuje hospitalizaciju novorođenčadi zbog infekcija donjeg respiratornog trakta za 72%, dok se za infekcije gornjeg respiratornog trakta rizik smanjio za 63%, ukoliko je dijete dojeno 6 mjeseci. Što se tiče upale srednjeg uha, rizik se smanjio za 50%, ukoliko je dijete dojeno više od tri mjeseca. Probiotici izolirani iz majčinog mlijeka (*L.gasseri* CECT5714, *L.salivarius* CECT5713, *L.fermentum* CECT5714) pokazuju inhibiciju adhezije *Salmonella cholerasuis* prema mucinima i povećavaju preživljavanje miševa zaraženih ovim patogenom. Probiotici su prema definiciji jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje primijenjene u životinja ili ljudi, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone kulture (Havenaar i sur., 1992; Šušković, 1996). Laktobacili i bifidobakterije inhibiraju rast patogenih mikroorganizama kao što su *S.aureus*, *S. typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *C. perfringes*. (Lara-Villoslada, Olivares, Sierra, 2007.).

2.2.2. Antiinflamatorno i imunomodulatorno djelovanje

Majčino mlijeko regulira imunološki sustav novorođenčeta te kolonizaciju probavnog sustava pomoću mutualističkih bakterija. Većina istraživanja se bazira na proučavanju mogućnosti određenih probiotika u modulaciji *in vitro* proizvodnje citokina pomoću stanica. Specifični probiotici kod novorođenčadi smanjuju kronične upale kože te upalne procese kao što je nekrotizirajući enterokolitis. Imunomodulatorno djelovanje mlijeka može objasniti povećanu proizvodnju antitijela kod dojenčadi u usporedbi s djecom koja nisu dojena (Civardi i sur., 2013)

2.2.3. Metaboličko djelovanje

Probiotici u majčinu mlijeku koloniziraju probavni sustav i povećavaju laktobacile. Laktobacili su gram-pozitivne bakterije te toleriraju kiselo okruženje. Bakterije mliječne kiseline, koje su stoljećima sastavni dio ljudske prehrane, mogu se smatrati prirodnim načinom opskrbe probavnog sustava aktivnim tvarima. Takve aktivne tvari su npr. enzimi (laktaza, reduktaza) i

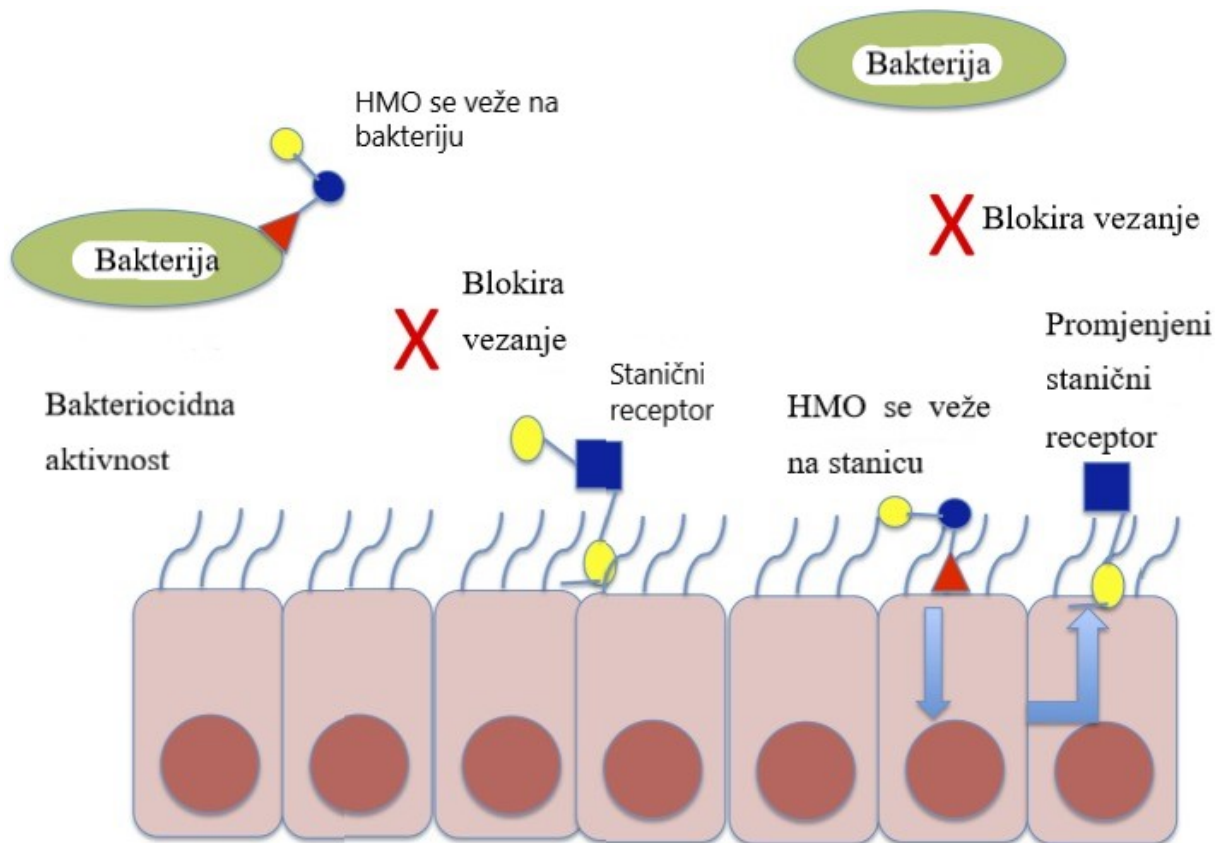
tvori koje antagonistički djeluju na nepoželjnu mikrobnu populaciju u probavnom sustavu čovjeka. Metabolički su aktivne u povećanju proizvodnje funkcionalnih metabolita kao što je butirat. Butirat je kratkolančana masna kiselina koja nastaje u ljudskom debelom crijevu kao produkt fermentacije koju provodi prisutna crijevna mikrobiota. Povećana koncentracija butirata u fecesu ukazuje na povećani volumen i učestalost stolice (Lara-Villoslada F. i sur., 2007).

2.3. Razvoj mikrobiote djeteta

Prije rođenja, probavni trakt fetusa se smatra relativno sterilnim dok nakon rođenja dolazi do ubrzane kolonizacije trakta. Na početku djetetova života, razvoj mikrobiote je prilično kompleksan. Okolišni čimbenici, uključujući način porođaja, dijetu, antibiotike pokazali su se relevantni u različitosti bakterija u probavnom traktu novorođenčeta. Tijekom prvih nekoliko dana života, crijeva su kolonizirana s raznovrsnim mikrobnim populacijama kao što su *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Enterococcus* i *Staphylococcus*. *E.coli*, *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* su najreprezentativnije vrste među prvim bakterijama u crijevima. Fakultativni anaerobi postepenom konzumacijom kisika stvaraju okoliš koji odgovara širenju obligatnih anaeroba kao što su *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Veillonella*, *Ruminococcus* i *Eubacterium*. Crijevna kolonizacija doživljava promjene uvođenjem krute hrane. Nedavna studija je pokazala da je rod *Bifidobacterium* dominantan tijekom prve godine života a zatim se smanjuje tijekom druge godine života. Krajem druge godine života, djetetova mikrobiota je značajno drugačija u usporedbi s prvom godinom života. Bakterijska kolonizacija nakon rođenja je nužna za razvoj crijeva i sazrijevanje imunološkog sustava. Uz ovo, prehrana igra važnu ulogu u razvoju mikrobioma koji štiti dijete (Berni i sur., 2007).

2.3.1. Oligosaharidi u mlijeku

Oligosaharidi u majčinu mlijeku imaju 3 do 32 šećera te se razlikuju po kompoziciji od oligosaharida drugih sisavaca. Pet monosaharida čine oligosaharide u mlijeku: D-glukoza, D-galaktoza, N-acetilglukozamin, L-fukoza i N-acetilneuraminska kiselina. Unatoč tome što nisu hranjivi izvor, oligosaharida ima u sličnoj količini kao i proteina u mlijeka. Predstavljaju prebiotike u mlijeku, koji selektivno potiču rast važnih probiotičkih organizama. Osim toga, oligosaharidi i njihovi proteinski konjugati su prepoznati kao inhibitori koji vežu patogene te funkcioniraju kao topljivi receptori za patogene koji imaju afinitet za vezanje na oligosaharidne receptore koji se nalaze na sluznici crijeva. (Morrow AL i sur., 2005).



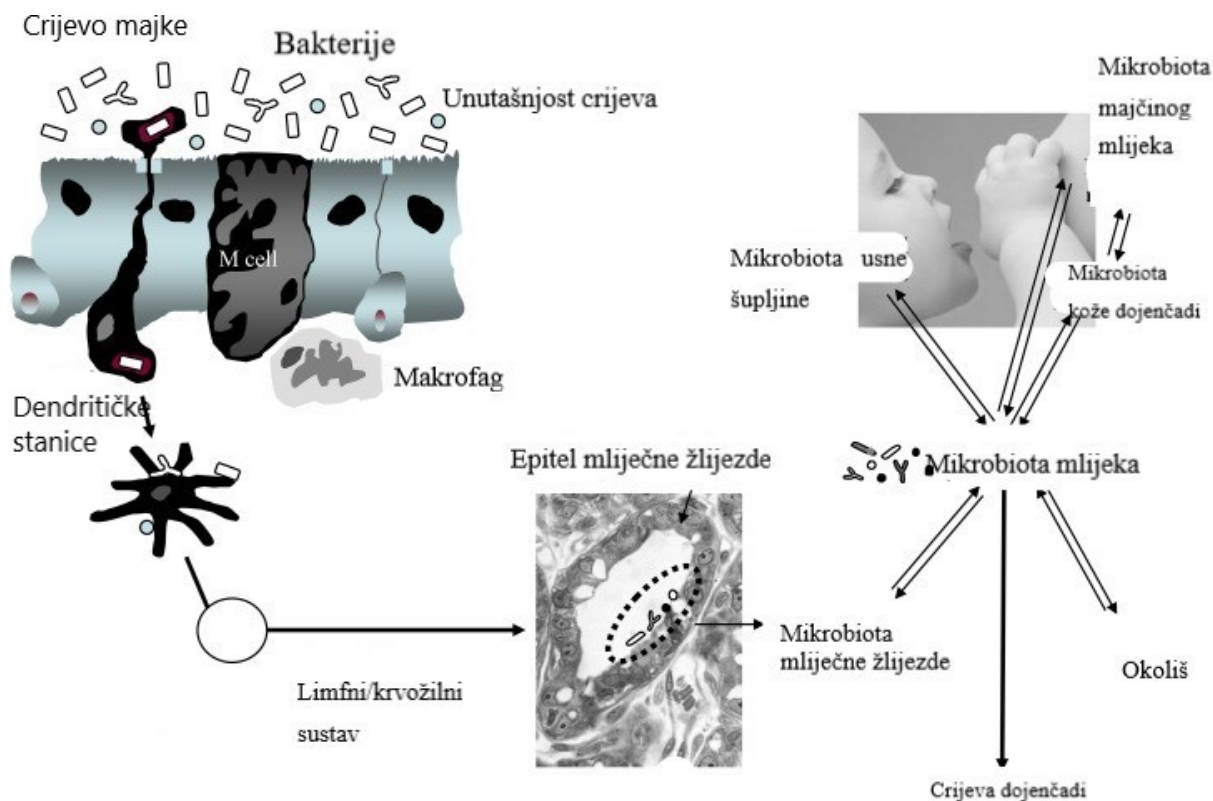
Slika 1. Mehanizam HMO za spriječavanje kolonizacije patogenim bakterijama (Le Doare i sur., 2018)

Strukture oligosaharida u mlijeku se razlikuju kod majki obzirom na njihove genetičke razlike (Newburg DS i sur., 2005). Upravo ta različitost među strukturama predstavlja mogućnost čovjekova opstanka, budući da se patogeni razlikuju po afinitetima kojima se vežu na specifične oligosaharide. Oligosaharidi pronađeni u majčinu mlijeku štite od nekoliko infekcija izazvanih bakterijama, virusima i parazitima. Većina studija o njihovoj ulozi u borbi protiv infekcija se baziraju na blokiranju interakcija koje posreduju u prvim koracima kolonizacije patogena. Bakterije, virusi i protozoe vezanjem na površinu stanica domaćina započinju širenje (Krachler AM, i sur., 2013). Jedan od načina kojim glikani iz mlijeka štite od bolesti je njihova mogućnost za mimikriju receptora s površine stanica i tako ometaju interakciju bakterija s receptorima na površini stanica i posljedično, kolonizaciju bakterija i virusa (Newburg DS i sur., 2005). Oligosaharidi pružaju zaštitu od infekcija izazvanih virusima, kao što je Norovirus. Norovirus je uzročnik akutnih infekcija probavnog sistema (Jiang X i sur., 2004). Navedeni uzročnik je odgovoran za otprilike 71 000 smrtnih slučajeva kod djece mlađe od 5 godina. Mimikrija

receptora im omogućava zaštitu od citotoksičnosti izazvanoj s bakterijama i protozoama (Lanata i sur., 2013).

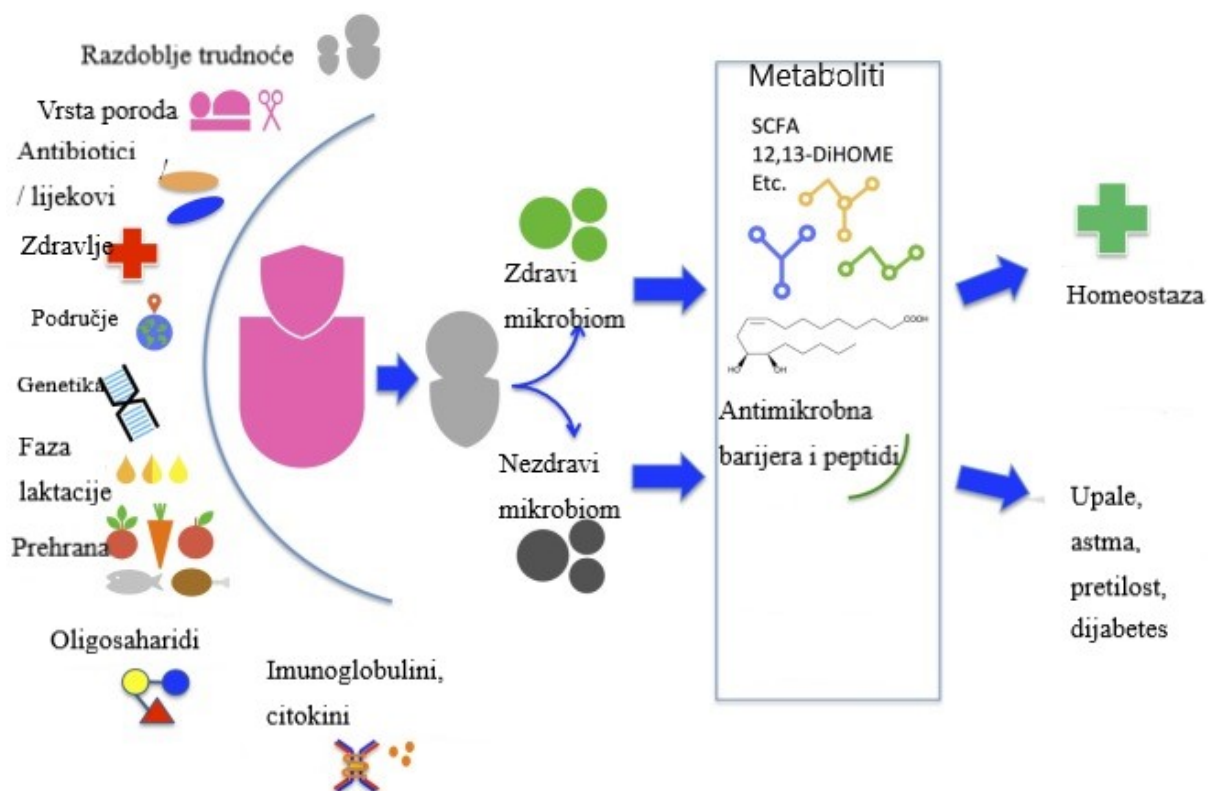
2.4. Mikrobiota majčinog mlijeka

Porijeklo bakterija u majčinom mlijeku nije u potpunosti razjašnjeno. Majčino mlijeko sadrži nekoliko stotina bakterijskih vrsta koje tvore 1000 kolonija po mililitru (CFUs) (Cabrera-Rubio R i sur., 2012). Procijenjeno je da dojenčad probavlja oko 800,000 bakterija dnevno (Heikkilä MP i sur., 2003.). Nakon mikroba koje novorođenče primi pri rođenju, majčino mlijeko je slijedeći fundamentalni izvor mikroba koji nastanjuje crijeva novorođenčeta (Gritz, 2015.). Tijekom prvog mjeseca života, dojenčadi koja su primarno hranjena majčinim mlijekom, feces sadrži 28% mikroba koji se nalaze i u mlijeku njihovih majki. Učestalost zajedničkih mikroba povećava se s udjelom dnevnog unosa majčinog mlijeka. Ovi nalazi snažno upućuju na prijenos mikroba iz majčinog mlijeka u crijeva. Iako postoje interindividualne varijacije tipova i obilje različitih bakterija u ljudskom mlijeku, bakterije koje se nalaze u crijevu najviše nalikuju bakterijama od vlastite majke. (Pannaraj PS, i sur., 2017). Među najzastupljenijim bakterijama u majčinu mlijeku mogu se naći *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacteria*, *Enterococcus* te *Enterobacteriaceae* (Fitzstevens JL i sur., 2017). U usporedbi su prijelaznim i zrelim mlijekom, kolostrum se ističe s većom raznolikošću među bakterijskim vrstama koje su prisutne u njemu (Cabrera-Rubio R i sur., 2012). Samo tkivo dojke sadrži raznoliku populaciju bakterija. Dinamično kretanje bakterija između majke i dojenčeta s retrogradnim protjecanjem od kožne flore majke do dojenčadi usne šupljine tijekom dojenja vjerojatno pridonosi bakterijskim zajednicama (Biagi E i sur., 2017). Međutim, mutualistička kontaminacija ne uzima potpuno u obzir raznolikost mikroba majčinog mlijeka ili prisutnost strogo anaerobnih vrsta kao što su vrste *Bifidobacterium*, *Clostridium* ili *Bacteroides*. Mikrobi pronađeni u mlijeku se razlikuju od onih koji su pronađeni u ustima dojenčadi (Hunt i sur., 2011). Nekoliko je predloženih teorija, a jedna od njih pretpostavlja da postoji put unutar mliječnih žlijezdi kojim crijevne bakterije majke migriraju do mliječnih žlijezdi tijekom trudnoće i laktacije (Jeurink PV i sur., 2013). Kao što je prikazano na Slici 2., pretpostavlja se da se bakterije prenose putem dendritičkih stanica i zatim cirkuliraju do žlijezdi pomoću limfnog sustava i krovotoka.



Slika 2. Shema koja prikazuje pretpostavku kako bi se bakterije mogle prenositi u crijevo dojenčadi (preuzeto od Juan M. Rodríguez, 2014).

Na Slici 3. prikazani su čimbenici koji utječu na mikrobiom majčinog mlijeka te predloženi mehanizam kako majčino mlijeko utječe na mikrobiom crijeva dojenčadi te na zdravstveno stanje. Bezbroj okolišnih, genetičkih te imunih faktora utječe na majčino mlijeko kojim majka hrani dijete. Već od prvog dojenja, mikrobi iz mlijeka te oligosaharidi doprinose sastavu te različitosti mikrobioma crijeva. Prvotni mikrobi u crijevima potiču kolonizaciju i može rezultirati stvaranjem zdrave okoline ili pak neprirodne okoline. Tijekom kritičnog razdoblja razvoja imunološkog sustava, zajednica može dovesti do metaboličkih izmjena, koje utječu na ishod zdravstvenog stanja. Veća raznolikost je uočena kod vaginalnog poroda, u usporedbi s carskim rezom (Cabrera- Rubio i sur., 2016). Ako se uzima u obzir dob majke, spol djeteta, rasa, nema značajnih razlika, međutim razlike se javljaju kod promjene geografske lokacije (Europa, Azija, Afrika) (Kumar H i sur., 2016). Koncentracija *Bifidobacterium* je viša kod poroda u terminu, za razliku od uranjenih poroda. Ukupna koncentracija bakterija izmjerena pomoću PCR-a, pokazala je nižu koncentraciju bakterija u kolostrumu nego u prijelaznom te zrelom mlijeku, uz povećanje *Bifidobacterium* i *Enterococcus* tijekom vremena (Khodayar-Pardo P i sur., 2014). Razlike u sastavu i različitosti mikrobiote mlijeka je uočena kod zdravih majki u usporedbi s majkama prekomjerne težine te oboljelim od celijakije i HIV-a, a ono što ne iznenađuje je činjenica da se kod majki koje su tijekom trudnoće u određenom period uzimale antibiotike, broj bakterijskih vrsta smanjio (Soto A i sur., 2014).



Slika 3. Različiti faktori koji utječu na sastav i različitost bakterijskih vrsta u majčinom mlijeku (preuzeto od Le Doare i sur., 2018)

2.5. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine specifičnu skupinu srodnih bakterija koje rastu u mikroaerofilnim ili samo u anaerobnim uvjetima te proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji proizvod metabolizma. To su gram-pozitivne, nesporogene, mezofilne bakterije, kemoorganotrofi, katalaza-negativne, nemaju citokroma, ne sintetiziraju porfirine, a rastu samo na kompleksnim hranjivim podlogama. Duga tradicija uporabe bakterija mliječne kiseline bez štetnog utjecaja na zdravlje čovjeka pribavila im je GRAS (Generally Regarded As Safe) status prema US FDA, odnosno QPS (Qualified Presumption of Safety) status prema legislativi Europske unije. BMK obuhvaćaju 20 rodova: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Sporolactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella*, *Actinomyces* i *Atopobium*. Zajednička karakteristika ovih bakterija je da imaju antimikrobno djelovanje prema različitim patogenim mikroorganizmima. Velik broj poželjnih svojstava intestinalne mikroflore pripisuje se bakterijama mliječne kiseline, posebice pojedinim vrstama bakterija koje uglavnom pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Poželjno djelovanje BMK na zdravlje domaćina u prvom redu obuhvaća:

poboljšavanje metabolizma laktoze, stimulaciju imunološkog sustava, suzbijanje urogenitalnih i crijevnih infekcija (prevenciju kolonizacije patogena mehanizmom kompetitivne ekskluzije), regulaciju koncentracije kolesterola, antitumorno djelovanje, suzbijanje alergijskih reakcija i modifikaciju crijeвне flore. Zbog ovih navedenih svojstava, poželjno je primijeniti BMK u prehrani i terapeutici kao probiotike, posebno u slučajevima poremećaja ravnoteže crijeвне mikroflore (Sanders i Huis in't Veld, 1999; Conway i Henriksson, 1994). Bakterije mliječne kiseline mogu djelovati antagonistički zbog sniženja pH uslijed nakupljanja organskih kiselina, proizvedenog vodikovog peroksida (u aerobnim uvjetima), proizvedenog diacetila i proizvedenih specifičnih inhibicijskih supstancija primjerice bakteriocina (Šušćović, 2000).

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci majčinog mlijeka

Prikupljeno je po 3 uzorka mlijeka svake majke prema sljedećem rasporedu:

1. unutar 7 dana nakon poroda
2. mjesec dana nakon poroda
3. mjesec dana nakon uvođenja krute hrane u prehranu djeteta

Ukupno je prikupljeno 9 uzoraka majčinog mlijeka za što je dobivena dozvola etičkog povjerenstva (Br. 380-59-10106-17-100/99, Klasa 641-01/17-02/01) Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Majčino mlijeko je smrznuto odmah nakon uzorkovanja i tako prebačeno u Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te pohranjeno na -20°C do daljnjih analiza.

Tablica 2. Uzorci majčinog mlijeka korišteni u ovom radu

Oznaka dojilje	Vrijeme uzorkovanja	Oznaka uzorka mlijeka
KR	Unutar 7 dana nakon poroda	KRM1
	Mjesec dana nakon poroda	KRM2
	Mjesec dana nakon uvođenja krute hrane	KRM3
MC	Unutar 7 dana nakon poroda	MCM1
	Mjesec dana nakon poroda	MCM2
	Mjesec dana nakon uvođenja krute hrane	MCM3
AF	Unutar 7 dana nakon poroda	AFM1
	Mjesec dana nakon poroda	AFM2
	Mjesec dana nakon uvođenja krute hrane	AFM3

3.1.2. Hranjive podloge

U radu su korištene sljedeće podloge:

- a) hranjiva podloga za uzgoj bakterija mliječne kiseline

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/l destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1; $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05; natrijev-acetat 5,0; agar 20,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 min.

b) hranjiva podloga za uzgoj bakterija iz roda *Lactobacillus*

- Rogosa agar sastava (g/L destilirane vode): pepton iz kazeina 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; D (+) glukoza 20,0; KH_2PO_4 6,0; amonijev citrat 2,0; natrijev acetat 15,0; magnezijev sulfat 0,575; željezov (II) sulfat 0,034; manganov (II) sulfat 0,12; agar 15,0. pH podloge iznosi 5,5 i podloga se ne smije autoklavirati.

3.1.3. Kemikalije

- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- Nuclease Free Water, „Takara“, Japan
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „Carlo Erba“, Italija
- EDTA, „Sigma-Aldrich“, SAD
- amonij-persulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- glicin, „Gram-mol“, Hrvatska
- akrilamid, „Sigma“, SAD
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilen), „Sigma“, SAD
- β -merkaptetoetanol, „Sigma“, SAD
- metilensko modri R-250, „Sigma“, SAD
- natrijev dodecilsulfat, „Sigma“, SAD
- ledena octena kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- standard za elektroforezu proteina ProSieve QuadColor (molekulske mase 4,6-315 kDa), „Lonza“, SAD
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- početnice „Invitrogen“, SAD
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Mannheim
- agaroza, „Appligane“, Francuska
- λ DNA HindIII standard, „Fermentas“, Kanada

- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen“, SAD
- Nuclease Free Water, „Takara“, Japan
- Genomic Wizard DNA Purification kit, „Promega“, SAD
- EmeraldAmp, Max HS PCR Master Mix (2x Premix), „Takara“, Japan
- GoTaq G2 Hot Start polimeraza, „Promega“, SAD

3.1.4. Aparatura i pribor

- epruvete
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- ependorfece
- kivete za centrifugiranje; 15 ml, 50 ml
- stalci za ependorfece
- stalci za epruvete
- pinceta
- igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD
- komora za elektroforezu, „Sigma“, SAD
- pinceta
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- termostad, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vodena kupelj, „Sutjeska“
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- magnetska mješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- tresilica, „New Brunswick Scientific“, SAD
- zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD
- BioSpec Nano, „Shimadzu“, Japan
- Sonopuls mini20 sonifikator, „Bandelin“, Njemačka
- elektroforetske kadice, „Cleaver, Scientific Ltd“, Velika Britanija
- DNA-termoblok, „Eppendorf“, SAD
- transiluminator MiniBIS Pro, DNT
- Maxwell® 16 Research System instrument, „Promega“, SAD

3.2. Metode rada

3.2.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu su korišteni sojevi bakterija mliječne kiseline prikazani u Tablici 1. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK).

Tablica 3. Bakterijski sojevi iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, korišteni u ovom radu

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Lactobacillus helveticus</i>	M92	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	D13	MRS, 37°C, anaerobno

3.2.2. Izolacija bakterija iz roda *Lactobacillus* iz majčinog mlijeka

Volumen od 100 µL svakog uzorka majčinog mlijeka je naciepljen u 2 paralele na Rogosa agar i razmazan štapićem po Drigalskom. Nakon dvodnevne anaerobne inkubacije pri 37 °C, nasumično je odabrano po 20 kolonija poraslih iz mlijeka svake majke i pomoću sterilne ušice je svaka od njih, u cilju umnožavanja, u obliku tankih linija naciepljena na svježi Rogosa agar. Nakon dvodnevne anaerobne inkubacije, bakterijska biomasa svake linije je naciepljena u 1,5 mL MRS bujona te anaerobno inkubirana. Sutradan, napravljen je streak plate svake bakterijske kulture na svježem Rogosa agaru kako bi se provjerila čistoća kulture. Nakon anaerobne inkubacije, ponovno je odabrana jedna čista kolonija sa svake ploče i ponovljen je postupak uzgoja bakterijske biomase te je nakon prekonoćne inkubacije izvršena provjera pH supernatanta svih sojeva poraslih u MRS bujonu te su izolirani sojevi pohranjeni na -80 °C.

3.2.3. Pohranjivanje bakterijskih sojeva

Čista kultura željenog soja se prethodni dan precijepi u 5 mL MRS bujona te inkubira preko noći na 37 °C. Nakon prekonoćne inkubacije, u dvije paralele se pomiješa 0,26 mL 87%-tnog sterilnog glicerola s 1,24 mL prekonoćne bakterijske kulture i tako pripremljeni sojevi se pohrane na -80 °C.

3.2.4. Održavanje i čuvanje bakterijskih sojeva

Sojevi bakterija mliječne kiseline su čuvani pri -80°C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi se inokuliraju u svježu hranjivu podlogu te inkubiraju anaerobno pri 37 °C.

3.2.5. Izolacija genomske DNA iz bakterijskih sojeva

Ekstrakcija genomske DNA iz bakterijskih sojeva se provodi pomoću Genomic Wizard DNA kita za izolaciju DNA. Po 5 mL prekonoćne kulture svake bakterije se centrifugira 2 minute na 13000-16000 g. Nakon uklanjanja supernatanta, talog stanica se resuspendira u 480 µL 50 mM EDTA i 120 µL otopine lizozima (10 mg/mL) te se inkubira u vodenoj kupelji na 37 °C 30-60 min. Nakon inkubacije, uzorak se centrifugira te se dobiveni talog stanica resuspendira u otopini za lizu jezgre koja je dio korištenog kita i inkubira u vodenoj kupelji na 80 °C 5 min. Nakon što se stanični lizat ohladi na sobnu temperaturu, doda mu se 3 µL otopine RNAze te se inkubira na 37 °C 15-60 min. Nakon ponovnog hlađenja na sobnoj temperaturi, uzorku se doda 200 µL otopine za taloženje proteina te se vorteksira 20 sekundi, inkubira 5 minuta na ledu i centrifugira na 13000-16000 g 3 minute. Supernatant koji sadrži DNA se prebaci u čistu epicu u koju je prethodno dodano 600 µL izopropanola sobne temperature te se izmiješa okretanjem epice dok niti DNA ne formiraju vidljivu masu. Nakon toga slijedi centrifugiranje, uklanjanje supernatanta i sušenje epice na čistom apsorbirajućem papiru. Talog DNA se zatim ispire sa 600 µL 70% etanola. Nakon sušenja uzorka 10-15 minuta na zraku, talogu se doda 100 µL otopine za rehidraciju DNA koja je dio kita za izolaciju te se talog rehidrira jednosatnom inkubacijom na 65 °C u vodenoj kupelji. Tako dobivena DNA se pohrani na 2-8 °C.

3.2.6. Mjerenje koncentracije DNA

Mjerenje koncentracije DNA izolirane iz bakterijskih sojeva, provodi se iz 2 µL uzorka pomoću uređaja BioSpec-Nano pri valnoj duljini 0,7 nm, pri čemu se kao slijepa proba koristi otopina za rehidraciju DNA koja je dio kita za izolaciju.

3.2.7. RAPD-PCR (eng. Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase chain reaction)

DNA izolirana iz bakterija mliječne kiseline kako je opisano u Poglavlju 3.2.5., služi kao kalup za RAPD-PCR reakciju u kojoj dolazi do amplifikacije DNA korištenjem univerzalne M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') početnice. Sastav reakcijske smjese volumena 25 µL prikazan je u Tablici 3. PCR reakcija se odvija prema uvjetima navedenim u Tablici 3. Nakon završetka PCR reakcije, 17 µl reakcijske smjese se nanosi na 1% agarozni gel i elektroforeza se provodi u kadici za elektroforezu pri naponu od 60 V. Standard se sastoji od 0,25 µL λ DNA HindIII i

0,5 µL 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, SAD). Nakon završetka elektroforeze, gel se boji u etidijevom bromidu koncentracije 0,5 µg/mL i vizualizira ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture.

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za provođenje RAPD-PCR reakcije

Sastojci reakcijske smjese	Volumen
EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix (2x Premix)	12,5 µL
Kalup (DNA)	2 µL
Počelnica M13	0,5 µL
dH ₂ O	10 µL
UKUPAN VOLUMEN:	25 µL

Tablica 5. Uvjeti provođenja RAPD-PCR reakcije

broj ponavljanja	T [°C]	vrijeme
1	94	1 min
	94	1 min
35	40	20 s
	72	80 s
1	72	5 min

3.2.8. PCR s početnicama za S-proteine

PCR reakcija se provodi prema uvjetima prikazanim u Tablici 4. U reakcijskoj smjesi se uz DNA i početnice Usl-1 (5'-GAATYGTKAGCGCTSGCTGC-3' i Usl-2 (5'-GTAAACGTAWGCGTTGTGCTTC-3') nalazi i pufer bez MgCl₂, dNTP, voda i GoTaq G2 Hot Start polimeraza u koncentracijama navedenim u Tablici 5. Kao negativna kontrola da fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije dviju početnica koristi se uzorak koji ne sadrži DNA. Standard se sastoji od λ DNA HindIII i 100 bp DNA Ladder. Dobiveni PCR produkti se razdvajaju u 1%-tnom agaroznom gelu elektroforezom pri 60 V. Nakon elektroforeze, gel se boja u etidijevom bromidu i vizualizira na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture.

Tablica 6. Uvjeti provođenja PCR reakcije s početnicama za S-proteine

broj ponavljanja	T [°C]	vrijeme
1	94	5 min

2	94	30 s
	63	30 s
	72	1 min
2	94	30 s
	62	30 s
	72	1 min
2	94	30 s
	61	30 s
	72	1 min
30	94	30 s
	60	30 s
	72	1 min
1	72	7 min

Tablica 7. Sastav reakcijske smjese za provođenje PCR reakcije

Reagensi	početna koncentracija	konačna koncentracija
pufer -MgCl ₂	5 x	1,00 x
MgCl ₂	25 mM	3,00 mM
Usl I	100 mM	1,00 mM
Usl II	100 mM	1,00 mM
dNTP	2 mM	0,20 mM
Taq polimeraza	5 U/mL	0,025 U/μL

3.2.9. Ekstrakcija površinskih proteina

Po 2 paralele prekonoćnih kultura sojeva uzgojenih u 5 mL MRS bujona se vorteksira i spoji u jednu kivetu te se izmjeri optička gustoća (OD) kulture pri 600 nm. Zatim se 1 mL kulture OD=2 centrifugira 2 min pri 16000 g te se talog stanica dobiven centrifugiranjem ispere s destiliranom vodom i resuspendira u 50 μL 2x koncentriranog reducirajućeg reagensa i prokuha 5 min. Nakon kuhanja, uzorak se centrifugira 2 min na maksimalnoj brzini okretaja kako bi se uklonili netopivi ostaci stanica. Supernatant koji sadrži proteine se prebaci u čiste epice i nanosi u jažice unaprijed pripremljenog poliakrilamidnog gela.

Priprema 2x konc. reducirajućeg reagensa (10 mL):

1,25 mL Tris-HCl (1M, pH 6,8)
 4 mL SDS (10% (w/v))
 2 mL glicerol (100%)
 0,5 mL EDTA (0,5 M)
 4 mg bromfenol plavo
 0.2 mL β -merkaptoetanol
 Nadopuniti destiliranom vodom do 10 mL

3.2.10. SDS-PAGE

20 μ L supernatanta uzoraka pripremljenih prema protokolu za ekstrakciju površinskih proteina se nanosi na 10%-tni poliakrilamidni gel. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) se provodi u komori za elektroforezu. Kao standard se koristi 5 μ L ProSieve QuadColor Protein Markera (4.6-315 kDa). Nakon nanošenja uzoraka u jažice, pokreće se elektroforeza pri slabom naponu od 60 V tijekom 15 minuta kako bi se uzorci spustili na dno jažice, a zatim se pojača na 130 V i vozi se pri konstantnom naponu 2 h. Nakon završene elektroforeze, gel se boji u otopini koja sadrži 0,02% Coomassie Brilliant Blue praha, 25% izopropanola i 10% octene kiseline kroz najmanje 2 h. Nakon bojenja, gel se inkubira u 10%-tnoj otopini octene kiseline do obezbojenja pozadine te skenira.

Priprema poliakrilamidnog gela (10%):

donji gel za separaciju (10%):

Tris (hidroksimetil aminometan)-HCl pufer pH 8,8	2,5 ml
akrilamid	2,5 ml
destilirana voda	2,5 ml
TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin)	5 μ l
APS (10%)	38 μ l

gornji gel za sabijanje (10%)

Tris-HCl pufer pH 6,8	2,13 ml
akrilamid	0,3 ml
TEMED	5 μ l
APS (10 %)	22,5 μ l

Priprema 10x konc. pufera za elektroforezu (1000 mL)

30 g Tris
144 g glicin
10 SDS

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Izolacija bakterija mliječne kiseline iz prikupljenih uzoraka majčinog mlijeka te ekstrakcija njihove genomske DNA

Majčino mlijeko sadrži brojne supstance koje pozitivno utječu na zdravlje dojenčeta, poput vitamina, oligosaharida, minerala, ugljikohidrata, zdravih masnoća, imunoglobulina (Rogier i sur., 2014) i antimikrobnih spojeva (Saavedra i Tschernia, 2002). Osim toga, majčino mlijeko sadrži i žive bakterije koje koloniziraju neonatalni gastrointestinalni trakt (GIT) dojenčeta i sudjeluju u kompetitivnoj ekskluziji patogena. Dojenče koje konzumira oko 800 mL majčinog mlijeka dnevno unese oko 10^5 - 10^7 komensalnih bakterija, zbog čega je sastav mikrobioma majčinog mlijeka vrlo često u korelaciji s neonatalnim mikrobiomom dojenčeta (Heikkilä i Saris, 2003).

Iz tri prikupljena uzorka majčinog mlijeka, uspješno je izolirano ukupno 60 novih bakterijskih sojeva koji će nakon precizne karakterizacije i identifikacije postati dio Zbrike mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura. Po 20 sojeva je izolirano iz mlijeka svake majke te imenovano oznakom dojlje te brojem od 1-20. Proveden je postupak ekstrakcije DNA iz uzorka, kojim se DNA kombinacijom kemijskih i fizikalnih metoda razdvaja od proteina, membrana i drugih sastojaka stanice iz koje se izolira. Provjera uspješnosti izolacije DNA napravljena je BioSpec-Nano spektrofotometrom te su rezultati vidljivi u Tablici 8.

Tablica 8. Prikaz rezultata mjerenja koncentracije dsDNA BioSpec-Nano uređajem

Uzorak	Koncentracija dsDNA (ng/ μ L)
KR1	517.85
KR2	637.39
KR3	1042.59
KR4	972.51
KR5	615.45
KR6	640.64
KR7	578.92
KR8	580.27
KR9	565.58
KR10	512.36
KR11	585.02
KR12	658.52
KR13	322.19
KR14	347.63
KR15	439.82
KR16	681.52
KR17	490.25
KR18	664.60

KR19	640.01
KR20	549.81
MC1	266.76
MC2	444.77
MC3	458.61
MC4	555.16
MC5	18.73
MC6	480.58
MC7	822.17
MC8	616.60
MC9	446.25
MC10	340.12
MC11	462.80
MC12	391.55
MC13	533.81
MC14	854.42
MC15	651.78
MC16	673.75
MC17	658.13
MC18	573.59
MC19	605.28
MC20	669.36
AF1	574.81
AF2	27.60
AF3	5.68
AF4	32.19
AF5	15.25
AF6	25.54
AF7	1.69
AF8	11.18
AF9	437.92
AF10	334.42
AF11	491.16
AF12	276.60
AF13	370.92
AF14	294.65
AF15	408.47
AF16	391.34
AF17	6.13
AF18	4.10
AF19	542.26
AF20	283.84

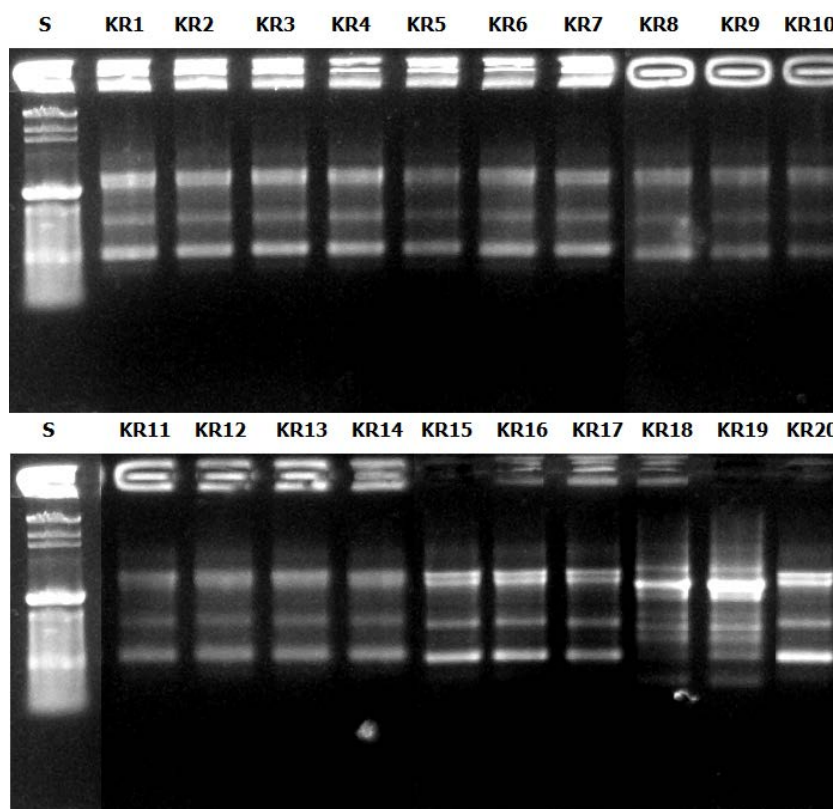
4.2. RAPD-PCR

Genomska DNA korištena je kao kalup za RAPD-PCR reakciju čiji je cilj bio odrediti genotipske profile bakterijskih izolata amplifikacijom DNA korištenjem univerzalne M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') početnice. RAPD metoda omogućava razlikovanje genetički različitih jedinki bez poznavanja njihove genomske sekvence. Polimorfizmi u sekvencama DNA različitih

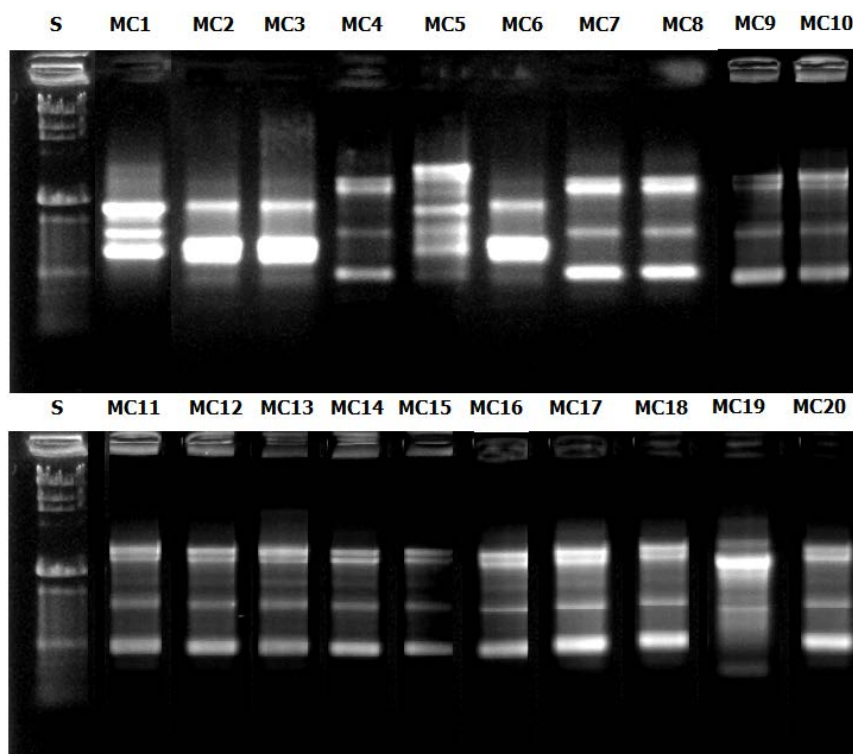
bakterija se mogu detektirati zahvaljujući varijacijama u mjestima vezanja početnica na DNA te razlikama u duljinama ampliciranih fragmenata.

Usporedba rezultata dobivenih nakon provedene RAPD metode ukazuje na genetičku sličnost gotovo svih izolata iz uzoraka majčinog mlijeka označenih kombinacijom slova i brojki KR1-20 (Slika 4), osim izolata KR18 i KR19, čiji se genotipski profili međusobno podudaraju, ali odstupaju od profila ostalih sojeva izoliranog iz istog mlijeka. Kod sojeva izoliranog iz mlijeka druge dojlje (Slika 5), uočljive su značajnije razlike među genotipskim profilima izolata. Sličnost je vidljiva kod sojeva MC2, MC3 i MC6 te sojeva MC4, MC7, MC8, MC9, MC10, MC11, MC12, MC13, MC14, MC15, MC16, MC17, MC18 i MC20, pri čemu potonji genotipski profili odgovaraju profilima većine izolata iz mlijeka prve dojlje (Slika 4). Sojevi MC1, MC5 i MC19 imaju jedinstvene genotipske profile koji se ne podudaraju s onima drugih sojeva. Kod zadnjeg uzorka mlijeka, uočena je genetička sličnost sojeva AF3, AF4, AF5, AF6, AF7, AF8, AF17 i AF18 te sojeva AF9, AF10, AF11, AF12, AF13, AF14, AF16, AF19 i AF20, dok su ostali jedinstveni.

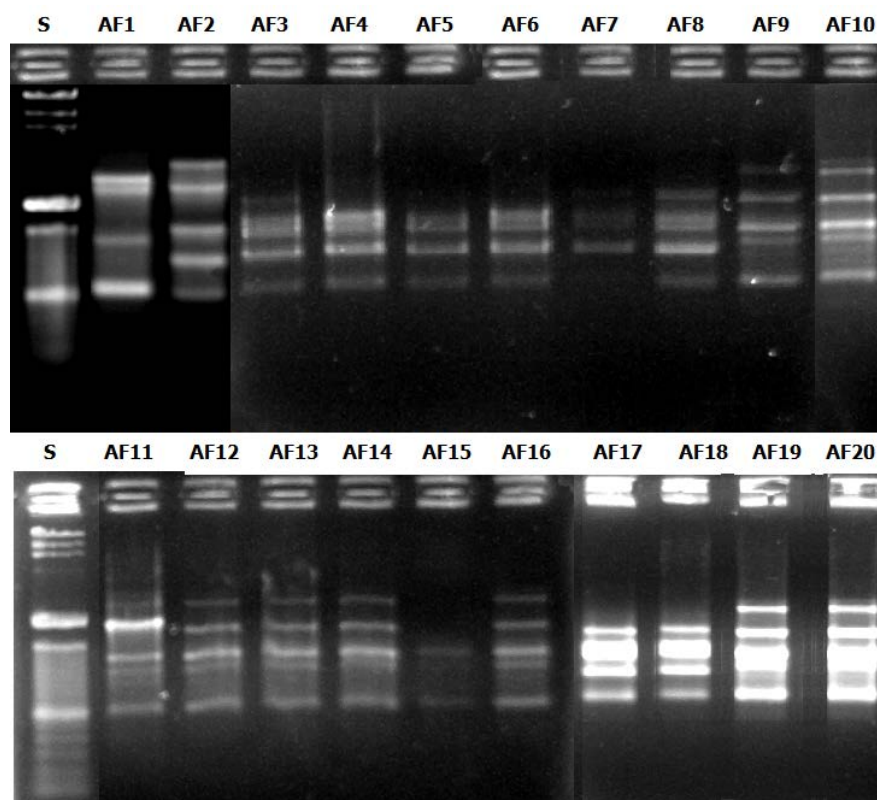
Iako se na temelju analize RAPD-PCR produkata mogu donijeti zaključci o genetičkim sličnostima različitih jedinki bez poznavanja njihove sekvence, problem metode je slaba ponovljivost i pouzdanost. Naime, ukoliko dođe do mutacije DNA u mjestu koje je u prethodnoj analizi bilo komplementarno primeru, konačan profil PCR produkta na agaroznom gelu neće biti isti kao u prethodnoj analizi.



Slika 4. Elektroforeza PCR produkata dobivenih RAPD metodom s M13 početnicom korištenjem DNA sojeva izoliranih iz mlijeka prve dojlje



Slika 5. Elektroforeza PCR produkata dobivenih RAPD metodom s M13 početnicom korištenjem DNA sojeva izoliranih iz mlijeka druge dojlje



Slika 6. Elektroforeza PCR produkata dobivenih RAPD metodom s M13 početnicom korištenjem DNA sojeva izoliranih iz mlijeka treće dojilje

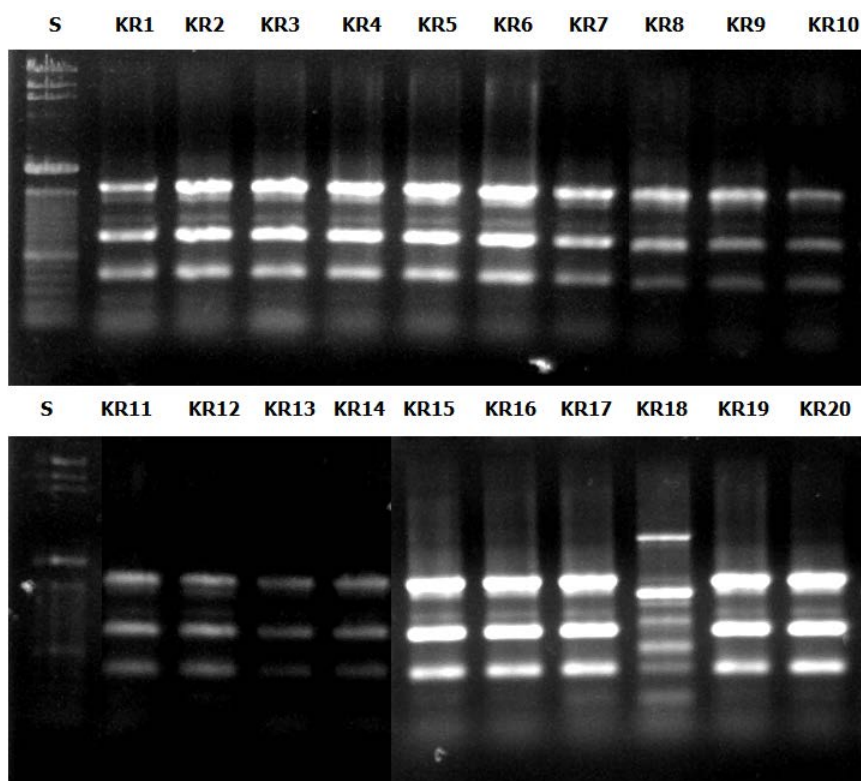
4.3. Analiza prisutnosti S-proteina

Većina mikroorganizama prisutnih u okolišu mora preživljavati u visokokompetitivnim staništima s drugim mikroorganizmima. Budući da su vanjski dijelovi stanice u direktnom kontaktu s okolišem i drugim stanicama, raznolikost u molekularnoj građi njihovih staničnih ovojnica, posebice najudaljenijih rubnih slojeva, odražava evolucionarne prilagodbe organizama specifičnim okolišnim i ekološkim uvjetima. Među najčešće proučavanim prokariotskim površinskim staničnim strukturama su dvodimenzionalni, nizovi površinskih S-(gliko)proteina koji u obliku sloja prekrivaju staničnu površinu stotina različitih vrsta gotovo svake taksonomske skupine Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija i arheja. Ekspresija S-proteina kod probiotičkih sojeva je rijetka ali je od iznimne je važnosti za iskazivanje njihovih probiotičkih svojstava. Naime, kao najizloženiji sloj mikroorganizama u odsutnosti kapsule i glikokaliksa, S-proteini su u direktnom kontaktu s bakterijskim okolišem i stoga vrlo često utječu na mnoga površinska svojstva, uključujući autoagregaciju i koagregaciju sa drugim bakterijama i plijesnima, adheziju na mucin, eukariotske stanice, proteine ekstracelularnog matriksa itd. Osim toga, važni su zadržavanje staničnog oblika, igraju važnu ulogu u površinskom prepoznavanju i služe kao zaštitni omotači od štetnih uvjeta okoliša uključujući promjene u okolišnom pH, mehanički i osmotski stres, antimikrobne peptide i bakteriolitičke enzime, radijaciju te bakteriofage i druge mikrobne predatore. S-slojevi kao metabolički vrijedni proizvodi mogu pružiti domaćinu selekcijsku prednost u veoma različitim staništima ali i imati ulogu molekularnih sita, molekulskih i ionskih zamki, imunomodulatora, faktora virulencije u patogenim organizmima itd.

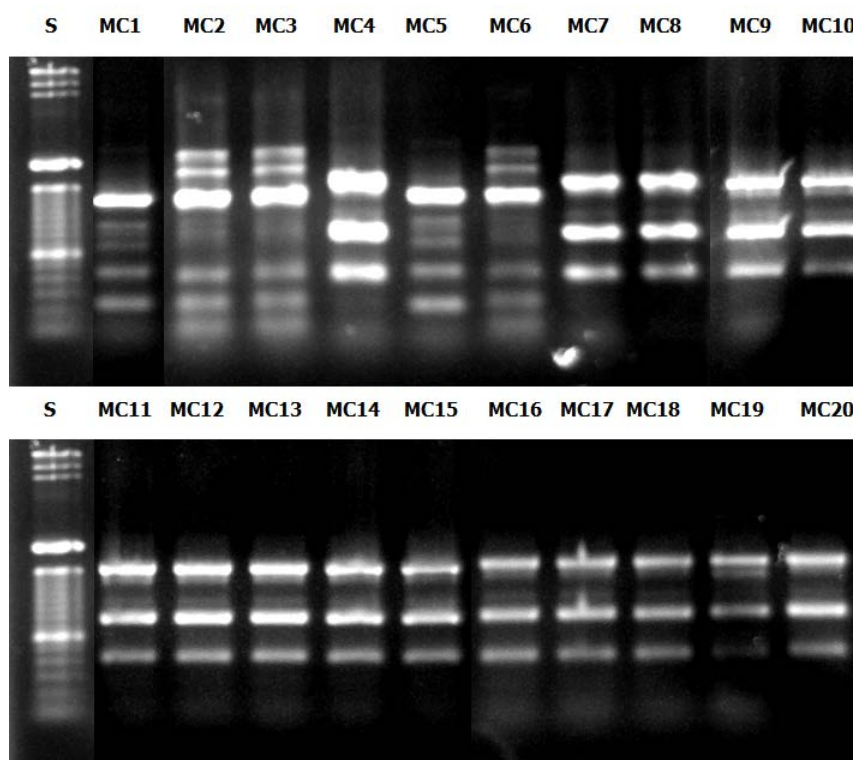
Ispitana je prisutnost gena koji kodiraju za S-proteine u genomu sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka pomoću Usl početnica. Kao što je vidljivo na Slikama 7 do 9, svi ispitani sojevi u genomu sadrže jedan ili više gena koji kodiraju za S-proteine, no to ne znači da su ti geni eksprimirani.

Stoga, provedena je ekstrakcija površinskih proteina iz svih izolata bakterija mliječne kiseline iz majčinog mlijeka te njihova SDS-PAGE analiza. Kao pozitivna kontrola prisutnosti S-proteina korišten je soj *Lactobacillus helveticus* M92, koji dokazano ekspirira S-proteine što je vidljivo na proteinskom profilu soja na Slici 10 u obliku karakteristične debele vrpce veličine oko 45 kDa. Na istoj slici se može uočiti da su uspješno izolirani površinski proteini svih sojeva

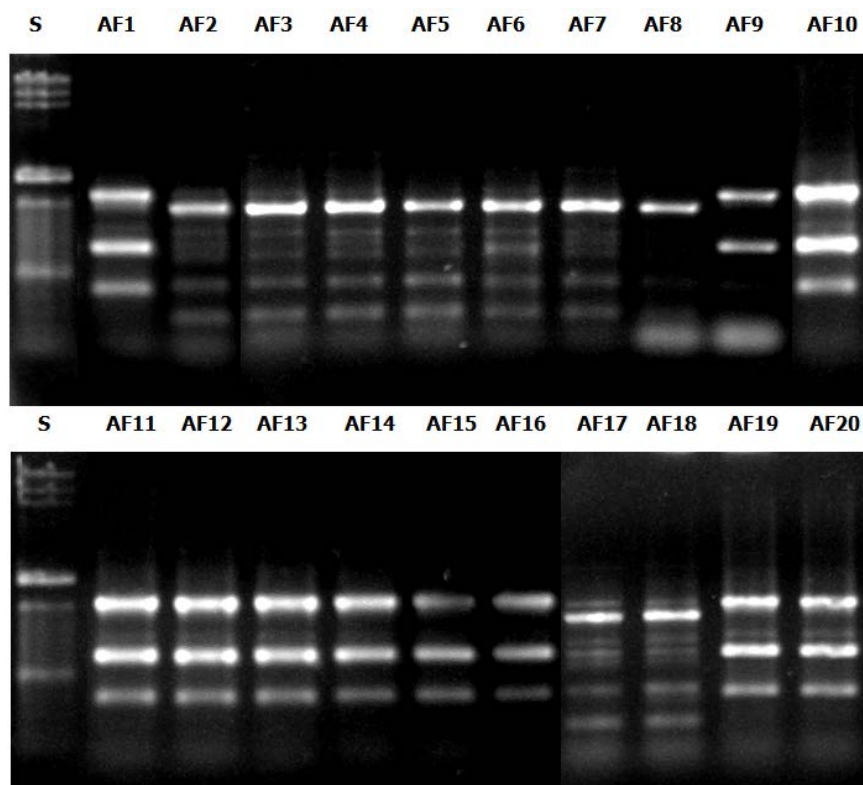
izoliranih iz majčinog mlijeka, ali nažalost, nijedan soj ne sadrži karakterističnu proteinsku vrpcu koja bi ukazala da eksprimiraju S-proteine.



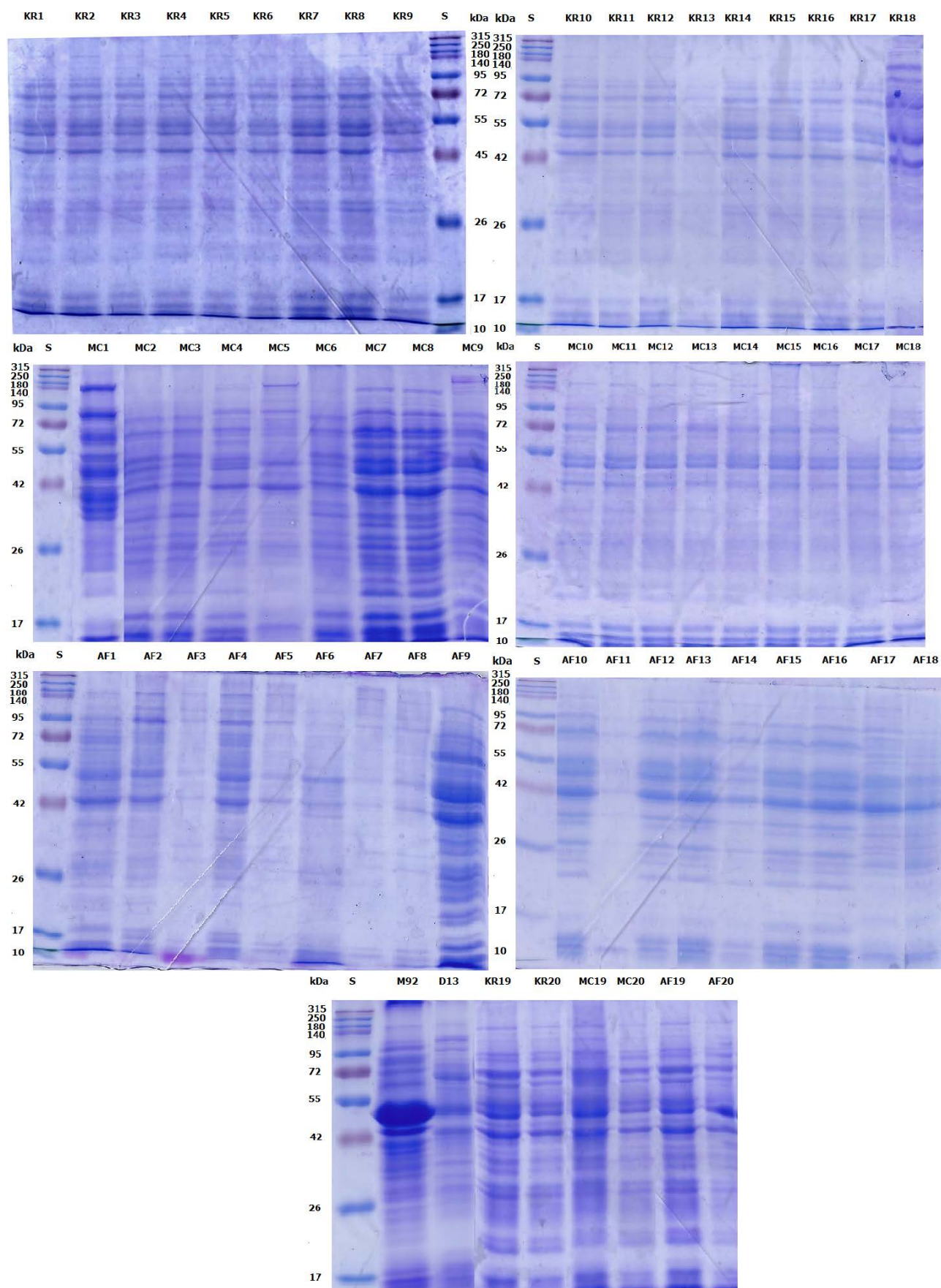
Slika 7. Detekcija prisutnosti gena koji kodiraju za S-proteine u genomu izolata iz majčinog mlijeka prve dojlje primjenom PCR metode sa specifičnim početnicama



Slika 8. Detekcija prisutnosti gena koji kodiraju za S-proteine u genomu izolata iz majčinog mlijeka druge dojilje primjenom PCR metode sa specifičnim početnicama



Slika 9. Detekcija prisutnosti gena koji kodiraju za S-proteine u genomu izolata iz majčinog mlijeka treće dojilje primjenom PCR metode sa specifičnim početnicama



Slika 10. Proteinski profili sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka dobiveni pomoću SDS-PAGE elektroforeze

5. ZAKLJUČCI

- 1) Iz tri prikupljena uzorka majčinog mlijeka, uspješno je izolirano ukupno 60 novih sojeva bakterija mliječne kiseline (BMK) koji će nakon precizne karakterizacije i identifikacije postati dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura.
- 2) RAPD-PCR analiza produkata dobivenih sa specifičnim Usl početnicama je pokazala da svi ispitani sojevi u genomu sadrže jedan ili više gena koji kodiraju za S-proteine.
- 3) Rezultati SDS-PAGE pokazuju da nijedan uzorak površinskih proteina ne sadrži karakterističnu proteinsku vrpcu koja bi ukazala da ispitivani sojevi BMK eksprimiraju S-proteine.

6. LITERATURA

Allen LH.(2012) B vitamins in breast milk: relative importance of maternal status and intake, and effects on infant status and function. *Adv Nutr.* **3** :362–369

Ballard Ollivia, JD, PhD (candidate) and Ardythe L. Morrow, PhD, MSc. (2013 Feb.) Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors, *Pediatr Clin North Am.*; **60(1)**: 49–74.

Berni Canani R, Passariello A, Buccigrossi V, Terrin G, Guarino A. (2008 Sep.) The nutritional modulation of the evolving intestine. *J Clin Gastroenterol.* 42 Suppl 3 Pt 2():S197-200.

Biagi E, Quercia S, Aceti A, Beghetti I, Rampelli S, Turroni S, Faldella G, Candela M, Brigidi P, Corvaglia L. (2017) The Bacterial Ecosystem of Mother's Milk and Infant's Mouth and Gut. *Front Microbiol.*; **8**: 1214.

Cabrera-Rubio R, Mira-Pascual L, Mira A, Collado MC, J Dev (2016) Impact of mode of delivery on the milk microbiota composition of healthy women.; **7**:54-60.

Castellote C, Casillas R, Ramirez-Santana C, Perez-Cano FJ, Castell M, Moretones MG, Lopez-Sabater MC, Franch A. (2011) Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *The Journal of nutrition* **141(6)**:1181–1187

Civardi, Garofoli, Tzialla, Paolillo, Bollani, Stronati. (2013) Microorganisms in human milk: lights and shadows, **26(52)**:30-34

Conway, P. L., Henrikson, A. (1994) Strategies for the Isolation and Characterisation of Functional Probiotics

Dawodu A, Zalla L, Woo JG, Herbers PM, Davidson BS, Heubi JE, Morrow AL. (2012) Heightened attention to supplementation is needed to improve the vitamin D status of breastfeeding mothers and infants when sunshine exposure is restricted. *Matern Child Nutr.*

González R, Maldonado A, Martín V, Mandomando I, Fumadó V, Metzner KJ et al. (2013). Breast milk and gut microbiota in Burundian mothers and infants from an area of high HIV prevalence. *PLoS One* 8: e80299.

Greer FR. (2001) Do breastfed infants need supplemental vitamins? *Pediatric clinics of North America*. **48(2)**:415–423.

Greenhalgh. Meyer, Aagaard, Wilmes, (2016) The human gut microbiome in health: establishment and resilience of microbiota over a lifetime **18(7)**: 2103-2116

Gritz EC, Bhandari V (2015) The human neonatal gut microbiome: a brief review. *Front Pediatr*. 3: 17.

Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R et al. (2013). The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* **69**: 1–10.

Fitzstevens JL, Smith KC, Hagadorn JI, Caimano MJ, Matson AP, Brownell EA, Systematic Review of the Human Milk Microbiota. *Nutr Clin Pract*. 2017 Jun; 32(3):354-364.

Haschke F, Haiden N, Detzel P, Yarnoff B, Allaire B, Haschke-Becher E. (2013) Feeding patterns during the first 2 years and health outcome. *Ann Nutr Metab*. **62** :16-25.

Havenaar, R., Huis in't Veld, J. H. J. (1992) Probiotics: A General View. U: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*, Vol 1, B. J. W. Wood (ured.), Elsevier Applied Science, London, str. 151-170.

Heikkilä M. P., Saris P. E. J. (2003). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol* **95**:471-478.

Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UM, Beck DL, Abdo Z et al. (2011). Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One* 6: e21313.

Ira Blekić. (2009) Mikrobni antagonizam bakterija mliječne kiseline, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Jeurink PV, van Bergenhenegouwen J, Jiménez E, Knippels LM, Fernández L, Garssen J, Knol J, Rodríguez JM, Martín R, Benef Microbes. (2013) Human milk: a source of more life than we imagine. **4(1)**:17-30.

Jiang X, Huang P, Zhong W, Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK. (2004) Human milk contains elements that block binding of noroviruses to histo-blood group antigens in saliva. *Adv Exp Med Biol.* **554**:447-50.

Khodayar-Pardo P, Mira-Pascual L, Collado MC, Martínez-Costa C J Perinatol. (2014) Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. **34(8)**:599-605.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. i Reuter, G. (1998) Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 103-125.

Krachler AM, Orth K Virulence. (2013) Targeting the bacteria-host interface: strategies in anti-adhesion therapy, **4**: 284-94.

Kos, B. (2001) Probiotički koncept: in vitro istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Kulski JK, Hartmann PE. (1981) Changes in human milk composition during the initiation of lactation. *Aust J Exp Biol Med Sci.* **59**: 101–114.

Kumar H, du Toit E, Kulkarni A, Aakko J, Linderborg KM, Zhang Y, Nicol MP, Isolauri E, Yang B, Collado MC, Salminen S *Front Microbiol.* (2016) Distinct Patterns in Human Milk Microbiota and Fatty Acid Profiles Across Specific Geographic Locations. **7**:1619.

Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE. (2013) Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF. **8**: 72788.

Le Doare Kristy, Beth Holder, Aisha Bassett and Pia S. Pannaraj. (2018) Mother's Milk: A Purposeful Contribution to the Development of the Infant Microbiota and Immunity. **9**:361

Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J et al. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* **143**: 754–758.

McGuire Michelle and Mark A McGuire. (2015) Human Milk: Mother Nature's Prototypical Probiotic Food? **6**:112–123.

Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. (2005) Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu Rev Nutr.* **25**:37-58.

Nommsen LA, Lovelady CA, Heinig MJ, Lonnerdal B, Dewey KG. (1991) Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study. *The American journal of clinical nutrition.* **53**: 457–465.

Ofstedal OT. (2012) The evolution of milk secretion and its ancient origins. *Animal : an international journal of animal bioscience.* **6**: 355–368

Olivares M, Albrecht S, De Palma G, Ferrer MD, Castillejo G, Schols HA, Sanz Y *Eur J Nutr.*(2015) Human milk composition differs in healthy mothers and mothers with celiac disease. **54**:119-28.

Pacheco Alline, Barile, Underwood and Mills. (2015) The Impact of the Milk Glycobiome on the Neonate Gut Microbiota, *Annu Rev Anim Biosci.* **3**: 419–445.

Pannaraj PS, Li F, Cerini C, Bender JM, Yang S, Rollie A, Adisetiyo H, Zabih S, Lincez PJ, Bittinger K, Bailey A, Bushman FD, Sleasman JW, Aldrovandi GM (2017) Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome **171**: 647-654.

Pang WW, Hartmann PE. (2007) Initiation of human lactation: secretory differentiation and secretory activation. *Journal of mammary gland biology and neoplasia.* **12**:211–221.

Perez PF, Doré J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, Segura-Roggero I, Schiffrin EJ, Donnet-Hughes A *Pediatrics.*(2007) Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? **119**:724-32.

Rogier E. W., Frantz A. L., Bruno M. E., Wedlund L., Cohen D. A., Stromberg A. J., Kaetzel C. S. (2014) Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**(8):3074-3079.

S. A. W. Gibson (ured.), Functional Probiotics. U: Human health: The Contribution of Microorganisms, Springer Verlag, London, str. 75-93.

Saarela T, Kokkonen J, Koivisto M. (2009) Macronutrient and energy contents of human milk fractions during the first six months of lactation. *Acta Paediatr*. **94**:1176–1181.

Saavedra J. M., Tschernia A. (2002) Human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications. *Br J Nutr* **2**:S241-246.

Sanders, M. E., Huis in't Veld J. (1999) Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. U: Proceedings of the 6th Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, Antonie van Leeuwenhoek **76**, 293-316.

Soto A, Martín V, Jiménez E, Mader I, Rodríguez JM, Fernández L J *Pediatr Gastroenterol Nutr*. (2014) Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. **59**:78-88.

Šušković, J., Kos, B., Goreta, J., Matošić, S. (2001) Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technol. Biotechnol*. **39**, 227-235.

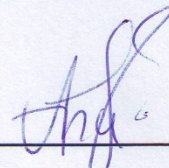
WHO . Infant and young child nutrition. Geneva: 2003.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Anja', is written over a horizontal line.

ime i prezime studenta